

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

ANNÉE 1926

THÈSE

N° 123

POUR

LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLÔME D'ÉTAT)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1926

PAR **Sanit KENGRAGSAT**

Né le 9 mars 1895, à Bangkok (Siam).

Médecin vétérinaire en mission d'études en France.

Certificat de Bactériologie de la Faculté de Médecine de Paris.

Certificat de Microbiologie de l'Institut Pasteur de Paris.

Certificat d'Hygiène et de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Paris.

Certificat de Vénérologie, Thérapeutique dermato-vénérologique de la Faculté de Médecine de Paris (Hôpital Saint-Louis).

Diplôme de Médecine Vétérinaire Exotique de l'École d'Alfort.

Assistant au Laboratoire de M. le Professeur Panisset, École d'Alfort.

Membre correspondant au titre étranger de la Société Vétérinaire Pratique et de la Société de Pathologie comparée de Paris.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

SUR LES

VARIATIONS DE LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE

ET

SUR L'IMMUNISATION CONTRE LE CHARBON

JURY { *Président :* LEMIERRE, Professeur à la Faculté de Médecine.
 { *Assesseurs :* VALLÉE { Professeurs à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort.
 PANISSET }

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

1926

THÈSE

POUR

LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

ÉCOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

ANNÉE 1926

N° 123

THÈSE

POUR

LE DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(DIPLOME D'ÉTAT)

Soutenue devant la Faculté de Médecine de Paris en 1926

PAR **Sanit KENGRAGSAT**

Né le 9 mars 1895, à Bangkok (Siam).

Médecin vétérinaire en mission d'études en France.

Certificat de Bactériologie de la Faculté de Médecine de Paris.

Certificat de Microbiologie de l'Institut Pasteur de Paris.

Certificat d'Hygiène et de Parasitologie de la Faculté de Médecine de Paris.

Certificat de Vénérologie, Thérapeutique dermato-vénérologique de la Faculté de Médecine de Paris

(Hôpital Saint-Louis).

Diplôme de Médecine Vétérinaire Exotique de l'École d'Alfort.

Assistant au Laboratoire de M. le Professeur Panisset, École d'Alfort.

Membre correspondant au titre étranger de la Société Vétérinaire Pratique
et de la Société de Pathologie comparée de Paris.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

SUR LES

VARIATIONS DE LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE

ET

SUR L'IMMUNISATION CONTRE LE CHARBON

JURY { *Président* : LEMIERRE, Professeur à la Faculté de Médecine.
 { *Assesseurs* { VALLÉE
 { PANISSET } Professeurs à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort.

PARIS

VIGOT FRÈRES, ÉDITEURS

23, RUE DE L'ÉCOLE-DE-MÉDECINE, 23

1926

CORPS ENSEIGNANT DE L'ÉCOLE D'ALFORT

Directeurs honoraires : MM. P.-J. CADIOT et H. VALLÉE

Directeur : Professeur E. NICOLAS

Professeurs honoraires : MM. G. BARRIER, Inspecteur général honoraire
des Écoles vétérinaires, P.-J. CADIOT, A. RAILLIET, H. VALLÉE

PROFESSEURS

	MM.
Anatomie descriptive des mammifères domestiques.	BOURDELLE
Physiologie, thérapeutique générale, matière médicale.	MAIGNON
Physique et chimie médicales, toxicologie, pharmacie	NICOLAS
Parasitologie et maladies parasitaires, clinique ; histoire naturelle médicale.	HENRY
Pathologie médicale des équidés et des carnassiers, clinique ; sémiologie et propédeutique ; jurisprudence	ROBIN
Pathologie chirurgicale des équidés et des carnassiers, clinique ; anatomie chirurgicale, médecine opératoire et ferrure	COQUOT
Pathologie bovine, ovine, caprine, porcine et aviaire, clinique ; médecine opératoire, obstétrique	G. MOUSSU
Pathologie générale et microbiologie, maladies microbiennes et police sanitaire, clinique	PANISSET
Histologie et embryologie, anatomie pathologique, inspection des denrées alimentaires ; autopsies	G. PETIT
Hygiène et agronomie ; zootechnie et économie rurale	DECHAMBRE

CHEFS DE TRAVAUX

MM. DELMER

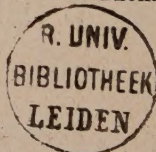
LEBLOIS

LESBOUYRIES

MM. MONVOISIN

R. MOUSSU

J. VERGE



La Faculté de Médecine et l'École Vétérinaire déclarent que les opinions
émises dans les dissertations qui leur sont présentées, doivent être consi-
dérées comme propres à leurs auteurs et qu'elles n'entendent leur donner ni
approbation, ni improbation.

A LA MÉMOIRE
DE SA MAJESTÉ LE ROI RAMA VI

HOMMAGE A SA MAJESTÉ
LE ROI PRAJADHIPOK RAMA VII

*Il aime la justice. Il gouverne
avec les talents d'un grand homme
d'état. Souverain éclairé, il cultive
les sciences et protège les savants.*

HOMMAGE
A SA MAJESTÉ LA REINE RAMPAI PARANI

HOMMAGE
A SA MAJESTÉ LA REINE SAVANG VATANA

HOMMAGE A SON ALTESSE ROYALE
LE PRINCE NAGARA SVARGA
PRÉSIDENT DE LA CROIX-ROUGE SIAMOISE

*Son cœur est charitable, généreux
et juste. Il s'est dévoué aux hôpitaux
et aux œuvres philanthropiques.*

HOMMAGE
A SON EXCELLENCE PRINCE TONGDHIKAYU
INSPECTEUR EN CHEF DE LA CAVALERIE
DE L'ARMÉE SIAMOISE

*Il a fondé l'Ecole vétérinaire mili-
taire de Bangkok. Il a construit les
haras nationaux de l'armée, et, dans
toutes ses œuvres, a déployé une
grande intelligence.*

A LA MÉMOIRE DE SON ALTESSE ROYALE
LE PRINCE ADISOR UDOMDEJ
ANCIEN INSPECTEUR EN CHEF
DE LA CAVALERIE DE L'ARMÉE SIAMOISE

A LA MÉMOIRE
DE MA TANTE CHAUCHOM MARDA RERN

*Elle m'a adopté et élevé dès mon
enfance avec le dévouement d'une
mère. Je lui garde mon souvenir
ému et reconnaissant.*

HOMMAGE A SON ALTESSE
LA PRINCESSE PISMAIPIMOLASAYA

HOMMAGE
A MON PÈRE ET A MA MÈRE

A MON FRÈRE

A TOUS MES PARENTS DE LA FAMILLE
ROHISTIRA

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

M. le Professeur LEMIERRE

Médecin des Hôpitaux
Chevalier de la Légion d'honneur.

*Qui nous a fait le grand honneur
d'accepter la présidence de notre
thèse.*

A M. le Professeur H. VALLÉE

Commandeur de la Légion d'honneur
Membre de l'Académie de Médecine
Membre du Conseil supérieur d'Hygiène publique de France
Directeur du Laboratoire de Recherches
du Ministère de l'Agriculture.

*Hommage d'admiration et de gra-
titude de son élève.*

A M. le Professeur L. PANISSET

Chevalier de la Légion d'honneur
Membre du Comité des Epizooties
Auditeur au Conseil supérieur d'Hygiène publique
de France
Adjoint au Directeur de l'Enseignement
de médecine vétérinaire exotique.

*En témoignage de notre reconnais-
sance pour les conseils qu'il nous a
prodigués sans cesse au cours de
notre stage et l'expression de notre
admiration pour son enseignement
dont nous avons tiré le plus grand
profit.*

A M. le Professeur NICOLAS

Directeur.

Hommage reconnaissant.

A M. VERGE

Chef de travaux.

*En témoignage de reconnaissance
pour ses conseils éclairés.*

A TOUS LES MAITRES
DE L'ÉCOLE VÉTÉRINAIRE D'ALFORT

A TOUS LES MAITRES
DE L'INSTITUT PASTEUR DE PARIS

A TOUS LES MEMBRES
DE LA CROIX-ROUGE SIAMOISE

A M. L. ROBERT

Ancien Directeur de l'Institut Pasteur de Bangkok.

Hommage reconnaissant.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES
SUR LES
VARIATIONS DE LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE
ET SUR L'IMMUNISATION CONTRE LE CHARBON

INTRODUCTION

Il n'est guère d'étude qui ait fait l'objet de plus de travaux que celle des variations de la bactériémie charbonneuse et de l'immunisation contre la maladie qu'elle détermine, elle pose des problèmes du plus grand intérêt pour le médecin et pour l'hygiéniste.

Chacun sait en effet que la présence de *Bacillus anthracis* dans un organisme malade ou dans un produit qui en provient peut provoquer l'infection, aussi bien chez l'homme que chez les animaux domestiques sensibles à la maladie.

Pendant notre stage à l'Ecole Vétérinaire d'Alfort, nous nous sommes attaché plus particulièrement à l'étude des maladies contagieuses.

Dans un pays comme le nôtre, le royaume de Siam, où les vétérinaires sont encore peu nombreux, leur rôle est à peu près exclusivement de s'employer à instituer des méthodes de prévention contre les maladies dont ils auront déterminé la nature.

Au Siam, le charbon est, avec la peste bovine, au premier rang des occupations du vétérinaire.

C'est la raison qui nous a porté à faire de cette maladie l'objet plus particulier de nos études et de nos recherches.

Sur les conseils de notre Maître, M. le Professeur Panisset, nous nous sommes livré à une étude documentaire des procédés de la prévention, on en trouvera l'exposé dans notre travail comme une introduction à nos recherches. Puis renseigné sur les imperfections, bien légères, de la méthode pasteurienne qui compte à son actif tant de milliers d'animaux protégés, nous nous sommes demandé si, parmi les nouveaux procédés de l'immunisation, il n'y en aurait pas qui serait susceptible d'être appliqué à la prévention de la fièvre charbonneuse.

L'action si curieuse du formol sur les toxines, dont la découverte et l'application devaient être si fécondes en résultats, nous a engagé à voir si le principe n'était pas applicable pour modifier la bactérie charbonneuse.

C'est cette étude qui a fait le thème de nos recherches personnelles et dont nous exposons les résultats dans ce travail.

PREMIÈRE PARTIE

LA FIÈVRE CHARBONNEUSE AU SIAM

Étude au point de vue sanitaire.

Toute la région orientale du Siam est une plaine basse, dont l'irrigation naturelle très développée expose le pays à l'inondation après la saison des pluies. De telles conditions sont favorables au développement et à la dissémination des maladies telluriques, tout particulièrement de la fièvre charbonneuse.

Cette maladie, véritable pandémie mondiale, sévit au Siam, comme on la rencontre partout ailleurs. On l'observe surtout à la fin de l'été, et après la saison des pluies. Toutes les espèces d'herbivores peuvent payer leur tribut à la maladie, c'est surtout chez le cheval qu'on l'observe le plus communément, elle est assez commune chez l'éléphant, elle est plus rare dans les autres espèces sensibles.

Les signes de la maladie sont ceux qui sont décrits à l'ordinaire. Il y a lieu de signaler pourtant la fréquence du charbon externe se traduisant par des tumeurs apparaissant à l'épaule, à l'encolure, à la gorge. L'évolution, dans ces cas, est ralentie, elle dure trois à huit jours, la guérison n'est pas exceptionnelle. Notons même que chez l'éléphant, le charbon ne se traduit guère autrement que par la dépression de l'animal atteint, son regard hagard, et l'existence d'engorgements chauds et douloureux en divers points du corps.

Jusqu'en ces dernières années, l'ignorance des gens du pays et l'absence de toute réglementation sanitaire expliquent que le charbon se soit perpétué. Le plus souvent, les cadavres étaient dépouillés pour exploiter la peau et pour livrer la viande à la consommation, après qu'elle eût été salée ; en général, cette viande salée était destinée à l'exportation ; quand la carcasse était inutilisable, et dans tous les cas les viscères étaient abandonnés dans les rizières ou jetés dans les rivières et les canaux.

Actuellement, une réglementation siamoise, inspirée de la législation sanitaire européenne, interdit de dépouiller les cadavres d'animaux morts du charbon, d'utiliser leurs peaux, de consommer ou de préparer leur viande. Les cadavres entiers doivent être enfouis à une profondeur telle qu'ils soient recouverts de deux ou trois mètres de terre après qu'ils ont été arrosés avec de la chaux ou quelque substance antiseptique.

Dans les grandes agglomérations, on a plus volontiers recours à l'incinération qui est obligatoire pour les cadavres des animaux, aussi bien que des hommes, ayant succombé à une maladie contagieuse. Les gens du pays préfèrent l'incinération à l'enfouissement, le bois est en grande abondance, la destruction par le feu est simple, sûre et peu onéreuse.

Quelles que soient les mesures prescrites et les conditions de leur application — il faut reconnaître que les Siamois sont disciplinés et se soumettent aux lois — la prévention rencontre de grandes difficultés en raison de l'existence du charbon chez les animaux sauvages comme l'éléphant non domestiqué, le bœuf et le buffle sauvages. Quand ces animaux sont atteints du charbon, leur dépouille souille le sol en même temps que se la disputent les corbeaux, les vautours, les carnassiers sauvages, tous capables, même sans être atteints, de disséminer les germes de la maladie.

L'existence de grandes forêts très épaisses donnent une importance considérable à cette face du problème.

Il est indispensable, d'autant plus que les mesures sanitaires sont insuffisantes, d'assurer la prévention par la vaccination. L'intervention décidée est obligatoire, elle est gratuite pour les troupeaux des indigènes, on ne la pratique qu'après la constatation d'un cas de charbon. C'est seulement dans les haras de l'Etat que la vaccination est pratiquée, systématiquement, chaque année, à titre préventif. La vaccination est faite selon la méthode pasteurienne avec du vaccin préparé à Bangkok, ou provenant de l'Institut Pasteur de Paris.

Malgré des pratiques hygiéniques, défectueuses ou rudimentaires, en dépit de la réglementation sanitaire, la transmission du charbon à l'homme est rarement signalée, peut-être est-elle plus commune qu'on ne l'imagine, mais la véritable nature de la maladie reste méconnue. Aucun cas de transmission n'est venu à notre connaissance pendant l'exercice de nos fonctions sanitaires. Il est vrai que si, malgré les prescriptions, il arrive que des gens du pays mangent de la viande charbonneuse, ils la consomment toujours après l'avoir fait cuire longuement à l'eau bouillante.

LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE

Ses caractères morphologiques et biologiques.

La recherche des variations de la bactéridie charbonneuse impose une connaissance de ses caractères normaux. Nous les donnons ici, au début de ce travail, en nous inspirant des données classiques, si nombreuses, en la matière :

La Bactéridie charbonneuse, ou Bacille du charbon (*Bacillus anthracis*) a été découverte par DAVAINÉ et RAYER (1850-1873) mais c'est PASTEUR (1877) qui a montré son rôle essentiel dans l'étiologie de la fièvre charbonneuse, par la suite KOCH, TOUSSAINT, CHAUVÉAU en ont fait une étude systématique. En raison de sa découverte à l'aurore de la bactériologie, en raison de la facilité avec laquelle il se prête à l'expérimentation, en raison aussi du grand intérêt économique qui s'attachait à la connaissance du charbon, *Bacillus anthracis* a été, pendant longtemps, le microbe d'étude favori dans les laboratoires.

FORME DU BACILLE

Dans le sang. — La bactéridie se présente sous forme de bâtonnets de 5 à 10 μ sur 1 à 1,5 μ , homogènes, isolés ou en chaînettes, de deux ou trois articles très près les uns des autres, leurs extrémités sont coupées carrément.

Après coloration, on constate que les filaments sont formés par une gaine hyaline délicate, renfermant une série de

masses protoplasmiques cubiques ou allongées, séparées les unes des autres par des cloisons transversales.

Dans les cultures, la gaine n'apparaît que dans des milieux renfermant du liquide d'ascite ou de sérum. L'existence de la gaine empêche la phagocytose, ce fait explique la relation entre la virulence et la faculté capsulogène.

Dans l'œdème, le bacille est un peu plus long.

Dans les cultures liquides, les filaments sont longs, flexueux, parfois enchevêtrés comme des paquets de fil. Ils ne sont jamais ramifiés.

Les filaments sont très longs, avec spores, dans l'humeur aqueuse.

Dans les cultures solides, on trouve beaucoup de bacilles courts.

Mobilité. — La bactériodie charbonneuse est immobile.

Coloration. — Le bacille se colore bien par toutes les couleurs basiques d'aniline; il reste coloré par la méthode de GRAM.

Les spores se colorent par les méthodes ordinaires, mais plus facilement par la méthode de MOLLER.

1^o MÉTHODE DE GRAM

1^o Fixer, ensuite colorer une à cinq minutes par la solution de violet de gentiane phéniqué;

Solution alcoolique de violet de gentiane	10 cc.
Eau phéniquée à 1 %	100 cc.

Sans laver.

2^o Verser sur la préparation quelques gouttes de solution de Lugol, qu'on renouvelle 2 à 3 fois en 4 ou 6 secondes;

3^o Décolorer par l'alcool à 95° ou l'alcool-acétone;

Alcool absolu	3 vol.
Acétone	1 vol.

- 4° Laver à l'eau;
- 5° Recolorer trente secondes par la safranine.
- 6° Laver à l'eau;
- 7° Sécher. Examiner, dans une goutte d'huile de cèdre à l'immersion.

2° COLORATION DES SPORES

Méthode de Mæller. — Fixer deux minutes par l'alcool absolu, puis deux minutes par le chloroforme. Sans laver, faire agir, sur la préparation : acide chromique à 5 %, trois à cinq minutes.

Colorer à chaud par la solution de fuchsine de Ziehl cinq minutes (ou à froid cinq heures).

Décolorer par l'acide sulfurique à 5 %, cinq secondes, ou par le chlorhydrate d'aniline (Solution aqueuse à 2 %), une minute, puis par l'alcool absolu.

Laver à l'eau. Recolorer avec la solution aqueuse à 1 % de bleu de méthylène une demi-minute, ou par le bleu de Kühne dilué à 1 p. 3. Laver à l'eau. Egoutter, sécher. Examiner à l'immersion.

SPORES

Les spores ont été découvertes par KOCH, en 1876. Elles n'existent jamais dans le corps de l'animal charbonneux vivant. Elles sont au contraire très rapidement abondantes dans les cultures. Chaque article des filaments donnera naissance à une (rarement à plusieurs) spore. KOCH a étudié la formation et l'évolution des spores charbonneuses dans une goutte suspendue d'humeur aqueuse, ensemencée avec du sang, et maintenue à + 35°, au bout de quelques heures, apparaît dans le protoplasme microbien un point réfringent qui grossit rapidement : c'est la spore.

Bientôt le protoplasme se désagrège; la spore est mise

en liberté, celle-ci grossit, perd sa réfrigérence, son enveloppe se résorbe, son protoplasme bourgeonne et forme un nouveau bacille. Pour la formation des spores, l'oxygène et une température de $+ 18^{\circ}$ à $+ 41^{\circ}5$ sont indispensables.

Pour WELL, les spores pourraient se former à l'abri de l'air. Chaque article ne produit en général qu'une spore ; quelques-uns restent stériles.

On obtient, en vingt-quatre heures, des spores, en cultivant sur agar pauvre (sans peptone).

CULTURES

Très aérobic. Végète entre $+ 15$ et $+ 45^{\circ}$, température optima = 35 , les milieux de culture neutres ou légèrement alcalins sont plus favorables ; la végétation est très rapide dans tous les milieux. *Bacillus anthracis* peut se transformer progressivement en anaérobic facultatif.

CULTURES SUR MILIEUX SOLIDES

Sérum. — Colonies blanc mat, tournant au gris, et liquéfiant légèrement le sérum.

Gélose. — Culture blanchâtre, épaisse, un peu visqueuse à bords dentelés.

Gélatine. — Liquéfiée très lentement.

a) *Piqûre* : Trait blanchâtre avec nombreux filaments très délicats, plantés à angle droit (sapin renversé). Ces arborisations peuvent manquer. Au bout de cinq à six jours, la gélatine se liquéfie à la partie supérieure ; vers le douzième ou quinzième jour la liquéfaction est totale. De gros flocons blancs finissent par tomber au fond de la gélatine liquide.

b) *Plaques* : Petites colonies blanches, qui deviennent ensuite brunâtres.

Au microscope, elles ressemblent à des cheveux enchevêtrés, les filaments étant groupés en torsades élégantes. Cette disposition est caractéristique. Il suffit de faire une préparation par impression, en laissant tomber sur la colonie une lamelle légèrement chauffée.

La gélatine se liquéfie à partir du cinquième ou du sixième jour. Le pouvoir protéolytique est extrêmement variable, suivant les échantillons de *Bacillus anthracis*, même avec les microbes isolés d'une seule colonie.

Pomme de terre. — Colonies blanchâtres, brunissant ensuite.

CULTURES EN MILIEUX LIQUIDES

Bouillon. — Cultures en flocons, le bouillon restant à peu près clair. Parfois, le bouillon est uniformément trouble, flocons au fond.

Lait. — Coagulation vers le troisième ou quatrième jour. Redissolution du coagulum vers le huitième jour, en tube et non en ballon.

IMMUNISATION PAR LES CULTURES ATTÉNUÉES. SÉRO-VACCINATION

Lorsque PASTEUR aborda l'étude du charbon, le problème de la vaccination anticharbonneuse avait à la fois un intérêt économique pour sauvegarder les troupeaux et un intérêt scientifique de premier ordre; on ne connaissait encore que les cultures atténuées du choléra des poules.

On savait que le charbon ne récidive pas chez l'homme. PASTEUR avait appris que les vaches guéries du charbon étaient devenues réfractaires, que des moutons ayant résisté à une première inoculation étaient également réfractaires. La possibilité de la vaccination s'imposait.

TOUSSAINT (1880) filtrait du sang charbonneux sur plusieurs doubles de papier, le chauffait à $+ 55^{\circ}$, obtenait ainsi un liquide vaccinal; la même année, CHAUCHEAU montrait qu'on pouvait obtenir la vaccination par inoculation d'un petit nombre de bacilles et que les agneaux, nés de mères charbonneuses, étaient réfractaires au *Bacillus anthracis*.

En 1881, PASTEUR, CHAMBERLAND et ROUX (février et mars) publiaient la découverte d'un vaccin charbonneux constitué par des cultures ayant une atténuation permanente, transmissible. En 1882 et 1883, CHAUCHEAU faisait connaître ses vaccins obtenus, soit par le chauffage, soit par l'emploi de l'oxygène comprimé.

La valeur de la vaccination par cultures atténuées (Méthode pasteurienne) a été consacrée par la mémorable expérience de Pouilly-le-Fort, où 25 moutons vaccinés résistèrent à l'inoculation qui tua les 25 témoins.

Bien des procédés ont été imaginés depuis PASTEUR pour modifier la bactériodie charbonneuse et vacciner les animaux sensibles, la plupart des tentatives n'ont qu'un intérêt documentaire et expérimental.

WOLDRIDGE aurait vacciné avec les cultures filtrées obtenues en bouillon de thymus et de testicule de veau. L'albumose de MARMIER peut immuniser.

HANKIN disait aussi avoir immunisé avec sa toxine. Ce furent à l'époque les seuls exemples (après l'expérience de TOUSSAINT) de vaccinations chimiques.

I. — VACCINS OBTENUS PAR CULTURES A DES TEMPÉRATURES DYSGÉNÉSIQUES

Ce sont les vaccins PASTEUR. Le principe est d'avoir des cultures sans spores, il suffit de cultiver à $+ 42^{\circ}5$. La bactériodie ne donne plus de spore et le mycélium qui cultive subit de jour en jour une atténuation régulière de sa virulence.

Si l'on vient à placer à 37° , une culture modifiée par un séjour plus ou moins prolongé à $42^{\circ}5$, il se forme des spores qui conservent la virulence du mycélium dont elles proviennent.

On peut rendre au bacille sa virulence, en se basant sur ce fait, que les jeunes animaux sont plus sensibles que les adultes. Tel vaccin qui est inoffensif pour le cobaye adulte tuera le cobaye d'un jour ou deux, etc..., si bien que l'action pathogène pour le cobaye de un, deux, trois ou quatre jours, est une véritable mesure de virulence. On inoculera donc des cobayes et des souris très jeunes et avec leur sang, des animaux un peu plus âgés, et ainsi de suite. On arrivera ainsi à rendre la virulence au vaccin.

Technique de la vaccination. — La vaccination des petits animaux de laboratoire (cobaye, lapin) est difficile à obtenir

en raison de leur sensibilité ; ils sont presque toujours tués par les vaccins (ROUX et CHAMBERLAND). La cuti-vaccination (BESREDKA) permet désormais de vacciner le cobaye. On peut inoculer au lapin qui supporte bien le premier vaccin, des virus intermédiaires entre le premier et le second vaccin (PASTEUR, FELTZ). Le lapin supporte dans les veines deux injections successives à un ou deux jours d'intervalle, de 40 centimètres cubes du premier vaccin, huit jours après, on lui injecte 0 c.c. 25 du second vaccin (ROUX et CHAMBERLAND). MARCHOUX est arrivé à vacciner le lapin avec les vaccins ordinaires, en injectant d'abord des doses faibles de premier vaccin cultivé et âgé de vingt-quatre heures.

II. — VACCINS OBTENUS PAR LE CHAUFFAGE

Ce sont les vaccins de TOUSSAINT, puis de CHAUVEAU. CHAUVEAU chauffe à $+ 47^{\circ}$ des cultures sans spores obtenues à $+ 42^{\circ}5$; pour obtenir des races définitivement atténuées, il opère de la façon suivante:

1^o Cultiver à $+ 42^{\circ}5$, pendant vingt-quatre heures.

2^o Chauffer trois heures à $+ 47^{\circ}$.

3^o Ensemencer et placer cinq à sept jours à 37° (cultures sporulées).

4^o Chauffer pendant une heure à une heure et demie à $+ 84^{\circ}$ ou $+ 82^{\circ}$.

Ces spores fournissent un vaccin à virulence fixe qui ne peut tuer le mouton.

Le premier vaccin a été chauffé à $+ 48^{\circ}$, le second à $+ 82^{\circ}$.

Ces vaccins conservent leur virulence atténuée, plus longtemps que les vaccins PASTEUR ; par contre, leur activité disparaît en quelques mois.

L'influence de l'oxygène est nulle dans ce procédé d'atténuation.

III. — AUTRES VACCINS

TOUSSAINT avait modifié le sang charbonneux avec des antiseptiques. CHAMBERLAND et ROUX ont diminué la virulence des cultures en s'inspirant du même principe. CHAUVÉAU a fabriqué des vaccins, employant l'oxygène comprimé, ce vaccin est utilisé au Chili.

PALADINO-BLANDINI (1903) a cherché à retirer du corps des microbes et des spores une substance chimique vaccinnante. La nucléo-albumine obtenue tue le cobaye en injection intraveineuse, par coagulation du sang, mais n'immunise pas, pas plus qu'elle ne rend le sérum agglutinant.

Séro-vaccination.

A. — BEHRING avait montré que le sérum des rats blancs jouit de propriétés bactéricides, vis-à-vis de *B. anthracis*. Ce sérum n'est cependant ni préventif, ni curatif, il faut qu'il soit mélangé à la culture pour en atténuer les effets. Injecté séparément, il ne préserve pas (METCHNIKOFF et ROUX).

B. — MARCHOUX (1895) aurait obtenu un sérum thérapeutique en inoculant à des moutons vaccinés des doses progressivement croissantes de cultures virulentes. On saigne quinze et vingt jours après la dernière inoculation. Ce sérum est actif à 1/1.000. Un centimètre cube de sérum injecté vingt-quatre heures avant l'infection préserve le lapin (2 kilogrammes contre l'inoculation sous-cutanée d'un quart de centimètre cube d'une culture virulente). Il faut des doses vingt fois plus fortes de sérum, si l'inoculation virulente est intraveineuse.

Ce sérum ne préserve pas le cobaye.

Injecté en même temps que la culture, il préserve inconstamment le lapin, même à de fortes doses.

Injecté après l'inoculation, mais avant l'apparition de l'œdème, il peut guérir le lapin.

C. — SCLAVO (1895) a préparé un sérum anticharbonneux, qui a été recommandé contre la pustule maligne de l'homme.

MANDEZ (1900) aurait obtenu un sérum assez actif pour guérir le mouton et le bœuf, à la dose de 1/2 centimètre cube et l'aurait appliqué au traitement de l'homme et des animaux.

JOURGUELIOUNASSE (1902) a obtenu par hyperimmunisation de la chèvre et du mouton un sérum doué de propriétés préventives pour le cobaye, le B. anthracis se développe dans le sérum mieux que dans le bouillon.

SAN FELICE (1903) immunise le chien; le sérum est préventif et curatif (pour le lapin, pour l'homme) mais pas bactéricide.

Le sérum anticharbonneux n'étant pas bactéricide, ni *in vitro*, ni *in vivo*, aurait le pouvoir de paralyser les échanges nutritifs de la bactérie (Immunité antiblastique d'Ascoli).

SOBERNHEIM a obtenu un sérum qui, à la dose de 2 centimètres cubes, protège le lapin contre 1/1.000 d'ose d'une culture virulente et contre l'ingestion des spores charbonneuses. Dès 1902, SOBERNHEIM a fait connaître une méthode de séro-vaccination.

On injecte aux animaux du sérum préventif en un point du corps (5 centimètres cubes pour le mouton) et cinq minutes plus tard, en un autre point, 1/2 ou 1/4 de centimètre cube, d'une culture dont la virulence correspond à celle du second vaccin de PASTEUR.

La valeur de la méthode est encore discutée.

Depuis les tentatives de SOBERNHEIM, l'Institut Pasteur

prépare et délivre régulièrement un sérum contre le charbon bactérien. L'emploi du sérum peut être associé à la pratique de la vaccination, soit à titre préventif dans les milieux contaminés, soit à titre palliatif chez des animaux infectés à l'état latent qui montrent des accidents après l'inoculation de l'un ou de l'autre des vaccins pasteurisés.

L'emploi du procédé de vaccination par inoculation intradermique, né des travaux de BESREDKA, et auquel nous avons déjà fait allusion, a posé de nouveau la question de la durée de l'immunité conférée par la vaccination notamment lorsque l'on a recours à ce procédé particulier d'insertion vaccinale. MM. VELU et VAYSSE ont apporté des expériences, poursuivies dans les conditions de la pratique, qui semblent devoir résoudre le problème.

Au mois de septembre 1924, deux foyers de charbon bactérien se déclarèrent sur des troupeaux de porcs, l'un dans la forêt de la Mamora, l'autre, dans la montagne de Tedders au lieu dit El Harcha. Le premier tue 60 porcs adultes en huit jours, sur un troupeau de 800 têtes; le deuxième provoque la perte de 11 porcs adultes, sur un troupeau de 150 têtes en cinq jours.

La vaccination des deux troupeaux est pratiquée, pour le premier le 21 septembre, pour le deuxième le 29 septembre; le vaccin injecté en une seule intervention par la méthode intradermique est employé sur les deux troupeaux sans sérumisation préalable chez tous les sujets sont vaccinés, même les jeunes âgés seulement de quelques jours; les épizooties meurtrières cessent aussitôt après la vaccination, grâce à l'immunité pour ainsi dire « explosive » obtenue par l'injection intradermique de vaccin.

Le 1^{er} mai 1925, 8 cas mortels de charbon bactérien dans le troupeau de porcs de la forêt de la Mamora et le même jour, deux cas sont signalés dans le troupeau de El Harcha de Tedders. La cause de la mort a été vérifiée au

Laboratoire. On se rend sur les lieux pour vacciner les deux troupeaux, le Samedi 2 mai dans la forêt et le Lundi 4 mai à El Harcha. On constate que la mortalité a sévi exclusivement sur des porcs âgés de 5 à 6 mois, donc sur des porcs nés après l'intervention vaccinale du mois de septembre dernier ; d'ailleurs, les propriétaires des troupeaux ont été les premiers à nous faire constater qu'il n'y avait pas eu de mortalités sur les animaux déjà vaccinés. C'est la raison qui avait amené à réclamer la vaccination contre le charbon bactériidien avant la confirmation du diagnostic par le laboratoire.

Cette observation due au hasard heureux et qui a la valeur d'une expérience de laboratoire fait nettement ressortir l'efficacité du vaccin unique et de la méthode intradermique lorsqu'elle est appliquée dans de bonnes conditions.

Dans les deux cas ci-dessus, l'immunité était encore suffisante après un délai de sept mois et dix jours. Il est regrettable que les propriétaires des troupeaux contaminés n'aient pas voulu conserver de témoins (animaux vaccinés en septembre 1924) qui auraient peut-être permis de constater la durée exacte de l'immunité.

VACCINATION CONTRE LE CHARBON BACTÉRIDIIEN

(*La Méthode actuelle*)

Vaccination proprement dite.

L'immunisation des animaux (moutons, chèvres, bœufs, chevaux), contre le charbon bactérien est réalisée par l'inoculation de virus atténués ou vaccins.

Ces vaccins sont envoyés par l'Institut Pasteur de Paris, en tubes renfermant du liquide pour 50 moutons.

Il y a deux vaccins : le premier vaccin et le deuxième vaccin.

Les tubes seront conservés à l'abri de la chaleur et de la lumière, le liquide qu'ils contiennent doit être employé dans toute sa fraîcheur. (Tout tube ouvert sera utilisé dans la journée).

Indications : Les vaccinations charbonneuses sont pratiquées dans tous les pays à charbon. En Europe, le moment le plus favorable est le printemps, afin que l'immunité soit conférée à coup sûr pendant la saison chaude, favorable à l'application de la maladie.

En Asie, on estime préférable de vacciner en hiver parce qu'en cette saison, la température est douce et correspond au printemps ou à l'automne européen. De plus, l'immunité est réalisée d'une façon certaine pendant la saison chaude et la saison des pluies.

L'immunité conférée n'étant que d'une année environ, il

est prudent de procéder tous les ans à la revaccination.

Mode d'emploi : on fait deux inoculations : la première avec le premier vaccin (vaccin le plus atténué); la deuxième, douze jours après, avec le deuxième vaccin (vaccin le moins atténué). Il est essentiel de ne pas injecter le deuxième vaccin à des animaux qui n'auraient pas reçu le premier.

Le liquide vaccinal est injecté sous la peau de la cuisse, quand il s'agit du mouton ou de la chèvre; en arrière de l'épaule, quand on a affaire aux animaux de l'espèce bovine; sur les faces de l'encolure, chez le cheval.

On se sert pour cela d'une seringue de Pravaz de 1 centimètre cube, divisée en huitièmes et stérilisable à l'eau bouillante.

Les deux vaccinations sont faites de la même façon, mais de côtés différents : cuisse droite, épaule droite ou face droite de l'encolure, par exemple, pour la première ; région gauche correspondante, pour la deuxième.

DOSÉS

Moutons, chèvres : Une division de la seringue, c'est-à-dire 1/8 de centimètre cube de chaque vaccin pour un animal, chaque seringue suffit à vacciner huit animaux.

Bœufs, chevaux : Deux divisions, c'est-à-dire 1/4 de centimètre cube de chaque vaccin pour un animal. Le contenu d'une seringue sert pour quatre animaux.

SÉRUM CONTRE LE CHARBON BACTÉRIEN

Ce sérum provenant de chevaux traités par des injections répétées de cultures, est expédié par l'Institut Pasteur de Paris, en flacons de 10 centimètres cubes. Il peut être conservé pendant un an à l'abri de la chaleur et de la lumière.

INDICATIONS

A) **A titre préventif.**

1^o Chez les animaux menacés passagèrement de contamination (foires, expositions, transports).

2^o Chez les animaux déjà contaminés.

Le sérum met immédiatement les animaux en état de défense contre l'infection menaçante et arrête la mortalité dans le troupeau.

SON EMPLOI EST ABSOLUMENT INOFFENSIF

B) **A titre curatif.**

Le sérum arrête l'évolution de la maladie à son début; son efficacité est d'autant plus certaine qu'on intervient plus vite. Aussi est-il recommandé de prendre la température de tous les animaux de l'étable contaminée et de traiter curativement ceux qui ont de la fièvre et sont probablement sous le coup de la maladie.

Il permet aussi de combattre et d'enrayer, à leur début, les accidents consécutifs à la vaccination.

MODE D'EMPLOI

Le sérum est injecté sous la peau d'une face de l'encolure avec une seringue de Pravaz, démontable et stérilisable par l'eau bouillante.

On obtient un effet plus rapide en faisant la première injection dans la veine jugulaire.

DOSSES

A) **Préventives.**

10 centimètres cubes pour le cheval et les bovidés adultes;
5 centimètres cubes pour les bovidés jeunes, le mouton et la chèvre.

Six à huit jours après, compléter l'immunisation par l'inoculation des deux vaccins pastoriens.

B) **Curatives.**

50 centimètres cubes pour la première injection chez les grands animaux; 20 centimètres cubes chez le mouton. Pratiquer ensuite, jusqu'à guérison, des injections sous-cutanées de 10 ou 20 centimètres cubes.

DEUXIÈME PARTIE

NOTIONS GÉNÉRALES SUR LES ANATOXINES

A maintes reprises, au cours de deux années passées au Laboratoire de M. le professeur PANISSET, nous avons eu l'occasion de pouvoir suivre divers essais entrepris pour l'étude de l'action biologique du formol. Tantôt, il s'agissait de l'action du formol sur le sérum (phénomène de la formol-gélification (E. NICOLAS), action sur les hémolysines (E. NICOLAS et L. PANISSET), plus souvent encore et plus longtemps nous avons collaboré pour rechercher l'action du formol sur les cultures microbiennes et sur les produits élaborés par les microbes ainsi que sur divers produits virulents. Ce sont les résultats acquis au cours de ces recherches qui ont engagé M. le professeur PANISSET à nous confier l'étude de l'action du formol sur la bactériodie charbonneuse et celle du pouvoir immunisant des cultures modifiées par cet agent chimique.

On sait combien les questions de cet ordre, nées des travaux de notre savant confrère, M. RAMON, sont d'actualité et comment leurs conséquences ont été admirablement exploitées. Nous avons pensé avant de rapporter nos essais et nos résultats qu'il était bon de faire un exposé général de l'état actuel de nos connaissances sur les anatoxines. Il nous a paru difficile de mieux faire que ne venait de le réaliser M. V. F. DROUIN et c'est à l'un de ses plus récents articles que nous avons fait de larges emprunts.

Parmi les innombrables travaux poursuivis dans le domaine de l'immunologie, au cours de ces dernières années, il n'en est peut être pas de plus remarquables que ceux qui ont conduit M. RAMON à la découverte des anatoxines. A la suite de longues et minutieuses recherches, notre distingué confrère est parvenu à dissocier les diverses propriétés des produits de filtration de cultures microbiennes et à confirmer que le pouvoir antigène n'est nullement fonction, comme on le croyait tout d'abord, de l'action toxique. Il a établi ce fait considérable qu'on peut déterminer une immunité active, solide et durable, par l'injection de produits dépourvus à la fois de virulence et de toxicité. C'est là une donnée entièrement nouvelle et imprévue. Elle présente un intérêt de premier plan, non seulement du point de vue théorique, mais encore par les conséquences pratiques qui en découlent dès aujourd'hui et par les applications multiples qu'elle permet d'entrevoir pour l'avenir.

Nous voudrions exposer brièvement l'état actuel de la question des anatoxines; il semble que la méthode la plus simple consiste à suivre, dans leur développement chronologique, les travaux qui ont abouti à cette conception.

FLOCCULATION

Dès le début de l'année 1922, M. RAMON s'était attaché à la recherche d'une méthode de titrage du pouvoir immunisant des sérums thérapeutiques qui permettrait d'éviter l'essai direct sur l'animal vivant. On sait, en effet, qu'il faut mettre en œuvre, pour le dosage des sérums, une quantité considérable d'animaux d'épreuve. Comme ceux-ci ne servent qu'une seule fois, l'opération devient d'une extrême complexité et finit par être irréalisable en raison de la difficulté qu'éprouvent les instituts sérothérapiques à se procurer les milliers de sujets indispensables.

M. RAMON s'était donc demandé s'il ne serait pas possible de tirer parti d'une réaction *in vitro* de la toxine sur l'antitoxine. Déjà, en 1909, CALMETTE et MASSOL (1) avaient pensé à se servir de la précipitation pour le titrage du pouvoir des sérums antivenimeux. Dix ans plus tard, NICOLLE, DEBAINS et CESARI (2) déterminent une technique spéciale qui leur paraît applicable aux sérums antidiphtérique et antitétanique. La toxine, concentrée et gélatinée, est recouverte d'une dilution du sérum à essayer ; la formation d'un anneau opalescent à la limite de superposition permet d'apprécier l'activité de l'antitoxine.

Après de nombreuses tentatives, RAMON (3) démontre que la précipitation peut se manifester, dans un mélange intime toxine-sérum et qu'elle y est soumise à certaines règles fixes dont il établit les lois. Lorsqu'on met en présence, dans une série de tubes à essais, un volume fixe de toxine et des volumes décroissants de sérum, on s'aperçoit qu'au bout d'un temps variable plusieurs de ces tubes deviennent opalescents. Puis, dans l'un d'eux, le précipité se rassemble en flocons, disséminés dans toute la hauteur du mélange, et qui tombent plus tard au fond du liquide. C'est ce phénomène qui a reçu le nom de floculation.

Le précipité ainsi déterminé est rigoureusement spécifique ; il ne se produit que par l'action de la toxine sur le sérum correspondant. Jamais on ne le voit apparaître quand on met en contact, par exemple, la toxine diphtérique et le sérum antitétanique ou antivenimeux. Il y a déjà ici une

(1) CALMETTE et MASSOL. Les précipitines du sérum antivenimeux vis-à-vis du venin de cobra. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1909, p. 155.

(2) NICOLLE, DEBAINS et CESARI. Précipitation mutuelle des toxines et de leurs antitoxines. Applications au titrage des sérums antidiphtérique et antitétanique, *C. R. Académie des Sciences*, 29 décembre 1919. *Id.*, *Annales de l'Institut Pasteur*, 1920, p. 596.

(3) RAMON. Floculation dans un mélange neutre de toxine-antitoxine, *Société de Biologie*, 25 mars 1922, p. 661.

indication nettement qualitative de la valeur du sérum.

Mais, fait capital en l'espèce, si on injecte à un cobaye d'expérience 1 ou 2 centimètres cubes du mélange qui a floculé le premier, on s'aperçoit qu'il a perdu toutes les propriétés des deux éléments dont il a été formé. Il n'est plus toxique alors que la toxine utilisée tuait le cobaye à la dose de 1/500^e de centimètre cube, on peut impunément en introduire mille fois la dose antérieurement mortelle sous la peau d'un cobaye neuf. Et il a perdu également les qualités du sérum : il n'est plus antitoxique ; il est incapable de protéger le sujet d'expérience contre l'intoxication par le filtrat de culture antidiphthérique. On peut donc considérer que les deux éléments formateurs se sont rigoureusement combinés et neutralisés par une sorte de saturation réciproque.

Les tubes voisins, au contraire, dans lesquels la flocculation ne s'est pas encore produite, conservent soit le pouvoir toxique (excès de toxine) soit le pouvoir immunisant (surabondance de sérum).

L'expérience répétée avec le même sérum et la même toxine se reproduit toujours identique à elle-même : seul, le temps nécessaire pour la flocculation varie suivant les conditions de température. Toujours la même quantité d'un sérum d'une même valeur antitoxique fait apparaître la flocculation initiale dans le même volume d'une même toxine. Si on fait varier la qualité d'un sérum employé, on voit la flocculation apparaître d'abord dans le tube auquel on a ajouté une quantité d'antitoxine exactement égale à celle qui la provoquait dans la première expérience. Pour un sérum d'une activité moitié moindre, les flocons se produiront donc dans le tube qui a reçu une quantité double du sérum mis en œuvre.

M. RAMON en tire cette première conclusion que la flocculation peut servir, en toute exactitude, d'indicateur de l'activité spécifique d'un sérum antidiphthérique. Il ne reste

plus qu'à mettre au point, pour l'application journalière, cette donnée fondamentale. C'est le but qu'il poursuit, au cours de 1922, avec M. le D^r L. MARTIN. Les résultats de leurs recherches figurent dans une seconde communication à la Société de Biologie (1).

TITRAGE DES SÉRUMS

Le problème consistait surtout à « raccorder », aussi exactement que possible, le procédé nouveau à la méthode de titrage *in vivo* préconisé par EHRLICH et à établir des tables de titrage permettant de déterminer, en valeur absolue, le pouvoir d'un sérum donné, par une simple réaction *in vitro*. Pour atteindre ce but, les auteurs préparent une batterie de tubes à essais renfermant chacun 20 centimètres cubes d'une toxine diphtérique de pouvoir connu. Quand on dispose d'une souche microbienne convenable, c'est au septième jour de la culture que le milieu passe par son maximum de toxicité. Filtré à ce moment, il donne une toxine susceptible, par exemple, de tuer un cobaye de 250 grammes à la dose de 1 /500^e de centimètre cube.

A cette quantité fixe de 20 centimètres cubes de toxine, ils ajoutent des doses progressivement décroissantes du sérum à titrer, variables entre 1 cc. 5 et 0 cc. 3. Le mélange est agité soigneusement, en renversant plusieurs fois chacun des tubes, puis abandonné au repos à la température du laboratoire. Il ne reste plus qu'à surveiller l'apparition du premier signe de floculation, qui se produit au bout d'un temps variable, entre deux et dix heures. C'est le premier tube présentant la réaction spécifique qui sert d'indice réel à la neutralisation. Une échelle, préalablement

(1) G. RAMON et L. MARTIN. Sur une méthode de titrage *in vitro* du sérum antidiphtérique, C. R. Société de Biologie, 1922, p. 711.

établie au moyen d'un sérum de valeur connue, sert de point de comparaison pour la détermination, en valeur absolue, du titre cherché.

Dans les conditions où les auteurs se sont placés, il fallait, par exemple, 1 centimètre cube de sérum à 200 unités d'EHRlich (1) pour neutraliser 20 centimètres cubes de la toxine employée. S'il suffit de 0 c. c. 25 du sérum à titrer pour provoquer la floculation de cette même quantité de toxine, on peut en conclure que le pouvoir antitoxique de ce sérum est quatre fois plus élevé que celui du précédent : il titre donc 800 unités. Si, au contraire, il est nécessaire d'ajouter 2 centimètres cubes de sérum pour obtenir le même résultat, c'est que le sérum est deux fois moins actif et ne titre que 100 unités. Lorsqu'on dispose d'une toxine connue, rien n'est donc plus facile que de titrer un sérum. La méthode est valable pour les cas habituels, entre 100 et 1.000 unités ; pour les cas extrêmes, on peut être conduit à opérer par dilution.

En comparant, par un très grand nombre d'essais, les résultats de la méthode nouvelle à ceux qu'on obtient par le procédé *in vivo*, MM. RAMON et MARTIN ont établi leur concordance absolue. Les légers écarts qui ont pu se produire ont toujours été en faveur de la méthode nouvelle.

Il restait pourtant à fixer certains points de détails, relatifs notamment aux temps de précipitation et aux conditions générales qui peuvent influencer la réaction. Ce sont ces points que M. RAMON (2) cherche à préciser dans une nouvelle communication. Après plusieurs milliers d'épreuves, il établit que le temps nécessaire à la floculation varie

(1) La méthode d'EHRlich consiste à mélanger 100 doses mortelles de toxine à des quantités variables du sérum à titrer. Ces mélanges sont éprouvés sur des cobayes. La quantité de sérum suffisante pour rendre inoffensives 190 doses mortelles renferme une unité d'EHRlich.

(2) G. RAMON. A propos du titrage *in vitro* du sérum antidiphthérique, Société de Biologie, 1922, t. I, p. 813.

de deux à dix heures et plus, à la température du laboratoire ; que le chauffage à 38° active la réaction, laquelle apparaît plus vite encore à 55°-56°. Mais, plus la température est élevée, plus il devient difficile d'apprécier avec certitude l'apparition du premier tube flocculant : la méthode perd alors en précision ce qu'elle gagne en rapidité, et il est préférable d'agir à la température ordinaire.

A partir de 60°, la floculation retarde, pour disparaître complètement au-dessus de 65°. En chauffant séparément la toxine et l'antitoxine, on s'aperçoit que la chaleur détruit plus vite le pouvoir flocculant du filtrat que celui du sérum. Jusqu'à 45°, la toxine n'est pas modifiée ; à partir de 50°, la réaction est moins active et il faut une moindre quantité de sérum pour provoquer la neutralisation, preuve que le pouvoir toxique est déjà modifié ; à partir de 58°-60°, la toxine a perdu toute activité toxigène.

Le sérum, au contraire, supporte sans perdre la moindre partie de son activité un chauffage prolongé à 55°-56° ; la précipitation en est seulement retardée. C'est seulement à partir de 60° qu'il perd à son tour son pouvoir précipitant et sa puissance antitoxique.

De ces diverses données est sortie une méthode pratique de titrage des sérums antidiphthérique aujourd'hui adoptée par tous les laboratoires. La combinaison *in vitro* de la toxine et de l'antitoxine spécifique présente tous les caractères et toute la précision d'une réaction physico-chimique. Sa supériorité sur la méthode biologique est indiscutable ; elle a par surcroît l'immense avantage d'être à la fois plus rapide et infiniment moins onéreuse.

TITRAGE DES SÉRUMS

Le phénomène est d'ailleurs réversible. De même que l'emploi d'une toxine connue permet de déterminer le pou-

voir d'un sérum à titrer, de même l'usage d'un sérum connu permet d'établir la toxicité d'un filtrat de culture. C'est ce que M. RAMON précise dans un travail publié en juin 1923 (1). Mais il démontre en même temps que cette donnée n'est valable que pour une période limitée. Si, en effet, on suit jour par jour la réaction d'une toxine, on s'aperçoit, que jusqu'au huitième jour de la culture, les deux pouvoirs floculant et toxique suivent exactement la même courbe. Mais à partir de ce moment, le pouvoir floculant reste stationnaire, alors que le pouvoir toxique commence à décroître. A la température ordinaire, il est diminué de moitié en moins de quatre mois. Conservée à l'étuve, la toxine se révèle, après quatre mois, complètement dépourvue de toxicité. Pourtant, elle a conservé, dans les deux cas, son pouvoir floculant tout entier.

C'est que le pouvoir floculant n'indique pas l'état toxique actuel, mais révèle, à un moment quelconque, le maximum de pouvoir toxique qui a été atteint au cours de la culture. Le pouvoir floculant est donc infiniment plus stable que la faculté toxigène. Et voici le point le plus important de toutes les observations recueillies jusqu'alors : une toxine peut, sous certaines influences, perdre son pouvoir nocif et conserver cependant son pouvoir floculant.

M. RAMON est dès lors conduit à penser qu'une telle toxine n'en reste pas moins susceptible de neutraliser l'antitoxine correspondante ; il est vraisemblable, par suite, qu'elle a conservé la propriété de provoquer la formation des anticorps spécifiques.

ANATOXINES

Pendant toute l'année 1923, M. RAMON s'attache à la solution de ce problème nouveau, et, dans une communica-

(1) G. RAMON. Pouvoir floculant et pouvoir toxique de la toxine diphtérique, Société de Biologie, 2 juin 1923, p. 2.

tion à l'Académie des Sciences du 10 décembre 1923 (1), il établit qu'une toxine ayant perdu tout pouvoir toxique, mais conservant sa faculté de floculation, reste susceptible de provoquer la formation d'un sérum antitoxique. C'est au produit ainsi modifié par la perte de sa toxicité qu'il donne, pour la première fois, le nom d'anatoxine.

La production de l'anatoxine peut être hâtée par l'action combinée de la chaleur douce et du formol. L'aldéhyde formique, en effet, n'entrave en rien le pouvoir floculant. Il suffit d'ajouter 3 ou 4 centimètres cubes de formol à un litre de toxine et de placer le mélange à l'étuve pendant un mois. Au bout de ce temps, toute toxicité a disparu mais le pouvoir floculant est resté intact. Si on injecte, sous la peau d'un cobaye, 1 centimètre cube d'un tel produit, qui l'aurait tué primitivement à la dose de 1/800^e de centimètre cube, l'animal n'en paraît nullement affecté; il ne présente ni lésions locales, ni symptômes généraux précoces ou tardifs. On serait, par suite, en droit de supposer que la solution a perdu toute activité. Il n'en est rien; car si, un mois plus tard, on recherche la résistance à l'intoxication diphtérique du sujet ainsi traité, on s'aperçoit qu'il supporte sans en être incommodé, de 50 à 100 doses mortelles de toxine fraîche. Par des injections successives du produit atoxique, il est aisé de renforcer la résistance de l'animal et de l'amener à supporter plusieurs milliers de doses mortelles.

Le fait est d'autant plus admirable qu'il est presque impossible d'immuniser le cobaye par la méthode habituelle, en raison de son extrême sensibilité à la toxine diphtérique.

(1) G. RAMON. Sur le pouvoir floculant et sur les propriétés immunisantes d'une toxine diphtérique rendue anatoxique (anatoxine), *C. R. Académie des Sciences*, 10 décembre 1923, p. 1338.

Sur la toxine et l'anatoxine diphtériques. Pouvoir floculant et propriétés immunisantes, *Annales de l'Institut Pasteur*, décembre 1923, p. 1001, janvier 1924, p. 1.

IMMUNISATION PAR L'ANATOXINE

En présence de résultats aussi frappants, M. RAMON se propose immédiatement d'appliquer les injections d'anatoxine à l'hyperimmunisation des chevaux producteurs de sérum. Et il démontre, en effet, que si on injecte à un cheval neuf, à sept jours d'intervalle seulement, d'abord 1 centimètre cube, puis 3 centimètres cubes d'anatoxine, on obtient, dès le cinquième jour après la seconde injection, un sérum qui titre déjà 6 unités d'Ehrlich, c'est-à-dire qui, injecté au cobaye à la dose de 1 centimètre cube, est susceptible de le protéger contre 600 doses mortelles de toxine.

En continuant les injections d'anatoxine à doses croissantes, on voit le pouvoir protecteur du sérum croître lui-même rapidement et dépasser bientôt, en un temps très réduit, celui qu'on peut obtenir par l'emploi direct de la toxine. Le pouvoir antigène dépend donc en fait, non du pouvoir toxique actuel du filtrat, mais de son pouvoir flocculant, lequel indique précisément le maximum de toxicité par lequel est passé la culture.

En raison de l'innocuité de l'anatoxine pour le cobaye, M. RAMON pense alors à l'utiliser pour la vaccination antidiphthérique de l'homme. Il s'injecte à lui-même, à tous risques, 0 cc. 25 d'anatoxine sans déterminer autre chose qu'une rougeur locale passagère, sans aucune réaction locale ou générale.

VITESSE D'APPARITION DES ANTICORPS

Mais une telle méthode ne peut être utilisée que si l'immunité se constitue assez rapidement. C'est à la recherche de la vitesse d'apparition des anticorps que M. RAMON s'atta-

che dès lors (1). Il démontre que, chez certains animaux, dès le troisième jour après l'injection d'anatoxine, et en tout cas au plus tard après cinq à six jours, le sérum renferme déjà au moins de 1 à 10 unités antitoxiques. Or, on sait qu'un homme dont le sang contient 1/40^e d'unité est à l'abri de l'intoxication diphtérique naturelle. Il apparaît donc que, dans un milieu contaminé, il doit être possible de mettre les enfants sains à l'abri de la contagion par l'injection d'anatoxine.

Dans cette même communication, l'auteur démontre que la méthode d'immunisation par les anatoxines est applicable à la peste. En injectant sous la peau d'un cheval 50 centimètres cubes de filtrat d'une culture en bouillon âgée de 4 semaines, additionnée, quelques jours avant la filtration, de 1,5 ‰ de formol, on peut, dès la 15^e heure qui suit, mettre en évidence le pouvoir flocculant du sérum produit vis-à-vis du filtrat employé. Dès l'absorption de l'antigène, on voit apparaître dans le sérum l'anticorps spécifique. Le procédé n'est donc pas spécialement applicable à la diphtérie; d'autres infections sont justiciables de l'immunisation par les anatoxines.

PRODUCTION DES SÉRUMS

Dès l'année 1924, plus de 150 chevaux ont été hyperimmunisés par cette méthode, d'une façon extrêmement solide, rapide et sans danger. Quelques-uns, ayant reçu d'emblée 25 centimètres cubes d'anatoxine, fournissaient, dix jours plus tard, des sérums titrant de 100 à 300 unités au centimètre cube, c'est-à-dire susceptibles de neutraliser

(1) G. RAMON. Sur l'apparition des anticorps, *C. R. Académie des Sciences*, 1^{er} septembre 1924, p. 485.

de 10.000 à 30.000 doses mortelles pour le cobaye. Par des injections qu'il est facile de répéter puis qu'elles sont inoffensives, on parvient à produire un sérum plus actif, d'une façon générale, que celui provenant de l'emploi direct des toxines. On peut même se servir directement de la culture totale additionnée de formol et abandonnée à l'étuve pendant un mois environ. Au bout de ce temps, elle est dépourvue de toute toxicité; elle peut être injectée impunément au cheval à doses massives et elle n'en détermine pas moins la production d'un sérum d'une activité parfaite.

VACCINATION DIRECTE

Restait à vérifier la possibilité d'utiliser les anatoxines pour l'immunisation directe de l'homme. Grâce à l'essai pratiqué par M. RAMON sur lui-même, plusieurs médecins, et en particulier MM. L. MARTIN, DARRE, LOISEAU et LAFAILLE, ROUBINOVITCH, ZÉLLER, LEREBoullet et JOANNON, HENSEVAL et NELIS, ont pu tenter la vaccination directe des enfants par l'anatoxine diphtérique (1). Après deux injections sous-cutanées, la première de 0 cc. 5, la seconde de 1 centimètre cube, on peut, en cinq à six semaines, obtenir une immunité solide et définitive. Il est dès lors possible de vacciner le personnel hospitalier ou les collectivités menacées par une épidémie, et ceci sans aucun danger, sans réaction locale ou organique appréciable.

L'expérience poursuivie comparativement dans des agglomérations a démontré toute la valeur de la méthode. Des essais sont en cours pour rechercher le parti qu'on en pourrait tirer dans le traitement de la maladie elle-même.

Le titrage de la valeur antigène d'une anatoxine peut s'exprimer aisément et avec précision par le nombre d'uni-

(1) G. RAMON. Sur l'anatoxine diphtérique et sur les anatoxines en général *Annales de l'Institut Pasteur*, janvier 1925, p. 1.

tés antitoxiques susceptibles de faire apparaître la floculation initiale dans 1 centimètre cube d'anatoxine. C'est ainsi qu'a été établie l'unité antigène ou anatoxique.

RÉSISTANCE DE L'ANATOXINE

L'anatoxine conserve très longtemps son pouvoir ; à la glacière, on le retrouve intact au bout d'un an ; à la température du laboratoire, il ne s'affaiblit que très lentement ; on remarque seulement un retard dans l'apparition de la floculation. Jamais l'anatoxine ne récupère sa toxicité.

Chauffée à 65° et même jusqu'à 70° pendant une heure, elle conserve son pouvoir antigène, alors que la toxine a déjà perdu le sien. Ce n'est qu'à partir de 72°-75° qu'elle est atteinte ; on peut donc lui faire subir sans inconvénients la tyndallisation.

APPLICATION AU TÉTANOS

Les résultats obtenus avec la diphtérie et la peste permettaient de penser que le procédé pouvait s'étendre à d'autres maladies. Dès le début de ses recherches, M. RAMON avait démontré que la toxine tétanique est douée aussi du pouvoir floculant et susceptible de fournir une anatoxine. Des travaux poursuivis sur ses indications par M. DESCOMBEY ont montré que tous les résultats obtenus avec la diphtérie peuvent être reproduits avec le tétanos, aussi bien lorsqu'il s'agit d'hyperimmuniser les producteurs de sérum que de vacciner activement des animaux réceptifs. Il est probable que l'anatoxine tétanique pourra remplacer, dans la médecine vétérinaire, le sérum spécifique, soit lors d'interventions chirurgicales, soit pour protéger les nouveau-nés contre l'infection par l'ombilic, soit même pour vacciner préventivement dans les régions tétanigènes. On obtiendra

ainsi, par l'emploi de l'anatoxine tétanique, une immunité active, beaucoup plus solide et infiniment plus stable que l'immunité passive, légère et fugace, résultant d'une injection de sérum.

Il est même probable que lors d'une campagne de guerre, on serait conduit à vacciner préventivement tous les combattants par une injection d'anatoxine : on éviterait ainsi les accidents parfois graves, qui résultent des injections répétées de sérum auxquelles les blessés peuvent être exposés.

BOTULISME ET GANGRÈNES GAZEUSES

Le botulisme et les gangrènes gazeuses sont également justiciables de l'emploi des anatoxines. Les recherches poursuivies par WEINBERG et ses collaborateurs ont montré déjà tout le parti qu'on en pouvait tirer contre ces infections par anaérobies. De sorte qu'on sera peut être conduit à associer les anatoxines gangréneuses aux anatoxines tétaniques pour la protection des blessés de guerre.

Il est possible même que la méthode puisse s'appliquer à la prévention du charbon symptomatique.

TOXALBUMINES ET VENINS

Les toxalbumines végétales, telles que l'abrine, la ricine, etc... peuvent elles-mêmes se transformer en anatoxines par l'action de la formaldéhyde, et servir ainsi à la préparation des sérums correspondants. La réaction de floculation est identique entre le sérum produit et la toxalbumine génératrice.

Enfin, par la même action du formol, on peut enlever aux venins leur pouvoir toxique, tout en leur conservant leurs qualités d'antigènes. La production des sérums antivenimeux en sera grandement facilitée.

SUBSTANCES ANATOXIGÈNES

L'aldéhyde formique n'est pas, d'ailleurs, le seul agent chimique susceptible de transformer une toxine en anatoxine. Déjà, au cours de ses premiers essais, M. RAMON avait démontré que la chaleur ménagée, par une action lente, pouvait conduire au même résultat, mais avec moins de régularité.

L'iode, employé sous forme de liqueur de Gram, assure également la transformation. Il convenait toutefois de rechercher si d'autres produits ne présenteraient pas une supériorité sur l'aldéhyde formique.

MM. A. BERTHELOT et RAMON (1) se sont attachés à déterminer l'action d'un très grand nombre de substances chimiques sur les toxines. Ils ont choisi, à cet effet, soit des acides (acétique, formique, etc.), soit des alcalis (ammoniaque), des alcools (éthylque, méthylque...), des éthers, des aldéhydes (éthylque, crotonique, benzoïque, acroléine...), la paraldéhyde, des cétones, le chloroforme, des acétals et toute une série d'autres agents qui pouvaient paraître, de par leurs propriétés générales, susceptibles d'une action neutralisante sur la toxine.

De ces longues et minutieuses recherches, les auteurs concluent que plusieurs substances sont douées d'une activité réelle. Mais c'est surtout au groupe des aldéhydes qu'il convient de s'arrêter : l'acroléine, les aldéhydes éthylque et crotonique sont des agents de transformation particulièrement efficaces. L'hexaméthylène-tétramine possède, de son côté, un pouvoir transformateur indiscutable.

Mais, par suite de leur action irritante sur les tissus organiques, la plupart des substances reconnues vraiment

(1) A. BERTHELOT et G. RAMON. Sur les agents de transformation des toxines en anatoxines, *C. R. Académie des Sciences*, 26 janvier 1925, p. 340.

actives ne peuvent être retenues. Seule, l'aldéhyde éthylique, qui agit lentement sur les toxines, peut être utilisée, au même titre que la formaldéhyde, pour la préparation de l'anatoxine tétanique, laquelle demande à être conduite plus doucement que celle de l'anatoxine diphtérique.

CONCLUSIONS

Ainsi, par des mises au point successives, il est permis d'envisager des perfectionnements de détails, des modifications sensibles de technique.

Mais le fait capital est dès maintenant établi d'une façon solide : grâce aux travaux poursuivis par M. RAMON au cours de ces dernières années, nous savons maintenant transformer l'antigène le plus dangereux en un produit inoffensif, l'anatoxine, qui n'en conserve pas moins toutes ses propriétés immunisantes. Une expérience déjà longue sur les animaux de laboratoire, transportée dans le domaine pratique sur les sujets producteurs de sérums, et jusque sur l'homme lui-même, démontre la haute valeur des anatoxines et l'innocuité de leur emploi. Il est permis d'espérer que la méthode est applicable à un très grand nombre de toxi-infections.

C'est là sans doute le progrès le plus considérable qui ait été réalisé dans l'étude de l'immunité depuis la découverte de la sérothérapie. Elle fait le plus grand honneur à M. RAMON, et nous devons être fiers qu'elle appartienne à l'un des nôtres.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES PERSONNELLES

Sous la direction de M. le Professeur PANISSET, nous avons recherché les caractères de la bactériodie charbonneuse dans des milieux de culture additionnés de formol. Notre but était de déterminer les variations morphologiques et biologiques de cette bactérie et plus particulièrement de voir si les changements survenus étaient de nature à transformer la bactériodie en vaccin.

Première série d'expériences.

Le 24 octobre, nous avons ensemencé comparativement le bacille du charbon dans des milieux de culture ordinaires : gélose, bouillon simple, sérum gélatiné et dans un milieu spécial formé de sérum de cheval gélifié par addition respective de X, XX, XXX gouttes de formol par 10 centimètres cubes.

Ce milieu est ainsi préparé :

On répartit aseptiquement le sérum de cheval dans une trentaine de tubes à essai stériles bien propres (10 centimètres cubes chacun). On ajoute dans chacun de ces tubes, I, II, III gouttes de formol, etc..., jusqu'à XXX gouttes. On incline ces tubes à l'étuve, à la température de 37°5, pendant vingt-quatre heures, ensuite on laisse ces tubes à la température ordinaire.

(*Observation.* — La coagulation de ces sérums formolés commence à partir de la III^e goutte de formol).

Nous avons cultivé la bactéridie charbonneuse dans de l'ascite artificielle préparée ainsi :

On prend 500 centimètres cubes de sérum de cheval dans un flacon bien propre. On verse un centimètre cube de formol, on remue fortement, ensuite on ajoute 1 centimètre cube d'ammoniaque. Etendre avec deux parties d'eau distillée. On répartit ce sérum dans les tubes essais, on stérilise à l'autoclave à la température de 110-115°, pendant quinze à trente minutes.

Les tubesensemencés ont été placés à l'étuve et observés après vingt-quatre heures. On note les caractères suivants :

1° *Sur la gélose* : la colonie est blanchâtre, épaisse, un peu visqueuse, à bords dentelés.

2° *Dans le bouillon* : cultures en flocons, le bouillon restant à peu près clair. Parfois le bouillon est uniformément trouble, avec flocons au fond.

3° *Sur le sérum coagulé* : la colonie est blanchâtre, claire.

4° *Sur le sérum formolé* : on n'observe aucun développement.

5° *Dans l'ascite formolée* : la bactéridie ne se développe pas non plus.

Deuxième série d'expérience.

Le 27 octobre 1925, nous avonsensemencé le bacille du charbon dans des nouveaux milieux de culture qui sont :

1° *Sur la gélose* : (pour contrôle) le développement est abondant.

2° *Dans le bouillon peptoné* : (pour contrôle) le développement est abondant.

3° *Sur le sérum formolé* : on met du formol en quantité variable : une demi-goutte, I, II, III, IV, V et jusqu'à

X gouttes par 10 centimètres cubes de sérum de cheval; le bacille ne se développe pas.

4° *Dans le bouillon formolé* : on met du formol en quantité variable : I. II, III gouttes par 10 centimètres cubes dans du bouillon peptoné; le bacille ne se développe pas non plus.

Cultures de la bactérie charbonneuse sur sérum formolé.
Première expérience, 24 octobre 1925. Résultats obtenus.

TABLEAU A

Etude expérimentale	Bouillon simple	Gélose simple	Sérum de cheval	Sérum de cheval formolé	Tubes de 10 c.c. de sérum de cheval avec addition de formol en gouttes												Bouillon formolé	OBSERVATIONS																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																											
					1/2 goutte	1 goutte	2 gouttes	3 gouttes	4 gouttes	5 gouttes	6 gouttes	7 gouttes	8 gouttes	9 gouttes	10 gouttes	20 gouttes			30 gouttes	1 goutte	2 gouttes	3 gouttes																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
Première série d'expériences 24 octobre 1925 26 octobre 1925 Ensemencé le bacille dans les divers milieux de culture.	+	+	+	I																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																									

N.-B. — I Pas de culture.
+ Culture bien développée.

NOUVEAUX ESSAIS SUR LA TOXICITÉ DE LA BACTÉRIDIE CHARBONNEUSE

Le 21 décembre 1925, nous avons fait de nouvelles expériences sur la toxicité des cultures de la bactéridie charbonneuse. Nous avons utilisé une culture additionnée de formol depuis un mois et conservée à l'étuve.

Nous avons inoculé cette culture à quatre cobayes à des doses différentes :

1°	Un cobaye (350 grammes)	:	1 cc.
2°	— (450 —	:	2 —
3°	— (500 —	:	5 —
4°	— (600 —	:	10 —

Après vingt-quatre heures, les cobayes présentaient un peu d'œdème local et quelques jours plus tard, l'œdème local avait disparu.

Quinze jours après, les cobayes sont encore bien portants.

Le 19 janvier 1926, au bout d'un mois, un cobaye, — marqué n° 3 — est mort. (Ce cobaye pesait 500 grammes). Nous avons fait l'autopsie de ce cobaye : il ne montre pas les lésions de la fièvre charbonneuse. Nous avons aussiensemencé le sang du cœur de ce cobaye dans deux tubes de gélose. Vingt-quatre heures plus tard, il n'y avait pas de bacille du charbon dans ces cultures.

Quarante jours après le commencement de l'expérience, le 3 février 1926, nous avons inoculé, aux 3 cobayes restants, le bacille du charbon virulent. Nous nous sommes servi d'une culture de vingt-quatre heures dans le bouillon, nous avons dilué ce bouillon au 1/10 dans le sérum physiolo-

gique, et chaque animal a reçu 1 centimètre cube de la dilution.

De ces cobayes, l'un (le n° 4 pesant 600 grammes), est mort après quarante-huit heures. Nous avons fait l'autopsie : il présente les lésions de la fièvre charbonneuse.

Les deux autres restent bien portants, mais trois jours plus tard, ils sont morts tous les deux. Ils présentent les lésions de la fièvre charbonneuse.

Cette première série d'essais montre que les cultures de la bactériidie charbonneuse additionnées de formol depuis un mois sont dépourvues de toxicité pour le cobaye, mais leur inoculation ne confère aucune immunité contre l'infection charbonneuse.

**Tableau résumé de l'expérience sur la toxicité
des cultures formolées de la bactériidie charbonneuse.**

TABLEAU B

Numéro	Désignation du cobaye et poids	Quantité de culture inoculée	Résultats de l'inoculation
1	Cobaye — 350 grammes	1 cc.	Inoculation le 21 décembre 1925.
2	— — 450 —	2 —	Après 24 heures, ils présentent un peu d'œdème et
3	— — 500 —	5 —	24 heures après l'œdème a disparu. Quinze jours après les
4	— — 600 —	10 —	cobayes sont encore bien portants. Le 19 janvier 1926, le
			cobaye numéro 3 est mort, il ne présente pas les signes
			de la fièvre charbonneuse. Quarante jours plus tard, le
			3 février, nous avons inoculé le bacille du charbon vivant
			aux cobayes qui avaient survécu à l'essai de toxicité, à
			la dose de 1 cc. chacun. Trois jours après tous sont
			morts.

PREMIÈRE SÉRIE D'ESSAIS D'IMMUNISATION DES COBAYES CONTRE LA FIÈVRE CHARBON- NEUSE AVEC DES CULTURES MODIFIÉES PAR LE FORMOL

Le 5 novembre 1925, nous avons ensemencé le bacille du charbon dans deux ballons contenant chacun 100 centimètres cubes de bouillon peptoné, et nous avons laissé ces cultures à l'étuve pendant vingt-quatre heures : le bacille s'est bien développé. Ensuite, nous avons mis dans chacun des deux ballons VIII gouttes de formol, et nous avons laissé ces cultures à l'étuve pendant dix jours pour laisser se produire les changements du bacille du charbon.

Dix jours plus tard, nous avons inoculé sous la peau de deux cobayes, à chacun 1 centimètre cube de la culture formolée, douze heures plus tard, les cobayes montrent un peu d'œdème local. Quarante-huit heures après, l'œdème a disparu et les cobayes sont bien portants. (Nous marquons cette culture A-I, A-II).

Le 5 novembre, nous avons ensemencé le même bacille dans deux ballons contenant la même quantité de bouillon peptoné que précédemment, et nous l'avons laissé dans l'étuve cinq jours. Ensuite, nous y avons mis VIII gouttes de formol, et nous avons laissé cette culture dans l'étuve pendant huit jours.

Huit jours plus tard (le 18 novembre 1925), nous avons inoculé cette culture à deux cobayes, 1 centimètre cube chacun. Douze heures après l'inoculation, les deux cobayes présentent de l'œdème local; vingt-quatre heures plus

tard, l'un est bien portant, l'autre est mort, mais il ne présente pas les symptômes, ni les lésions de la fièvre charbonneuse. (Nous marquons cette culture B-III, B-IV).

Le 5 novembre 1925, nous avons préparé un bouillon comme ceux désignés sous les marques A et B, nous y avons mis VIII gouttes de formol après huit jours et nous avons laissé cette culture dans l'étuve six jours.

Le 20 novembre 1925, nous avons inoculé la culture à deux cobayes. Après vingt-quatre heures, ils ont montré un peu d'œdème local. Quatre jours plus tard, l'un est bien portant, l'autre est mort. Nous avons autopsié le cadavre de ce cobaye sans trouver aucun signe de la fièvre charbonneuse. (Nous marquons cette culture C-V, C-VI).

Le 1^{er} décembre 1925, dix jours après la dernière expérience, nous avons inoculé la culture virulente du bacille du charbon. La culture en bouillon peptoné de vingt-quatre heures est diluée dans le sérum physiologique dans la proportion de 1 pour 10. Puis, nous avons inoculé 1 centimètre cube de cette dilution à chacun des cobayes qui ont survécu aux expériences, savoir : deux de la série A, un de la série B et un de la série C; et nous y avons joint un cinquième cobaye pour le contrôle.

Deux jours après, les 4 cobayes des trois séries sont tous morts, ainsi que le cobaye de contrôle. Nous avons fait l'autopsie des cadavres qui présentent les caractères suivants :

Il y a de l'œdème gélatineux local, ressemblant à du blanc d'œuf, incolore ou à peine rosé; les ganglions voisins tuméfiés, ecchymotiques, entourés d'œdème.

Le sang est noir; les globules rouges sont déformés et réunis en masses irrégulières. La rate est congestionnée, turgescente, molle; tous les organes sont congestionnés; la vessie est pleine d'urine sanguinolente.

Chez les cobayes inoculés au préalable, nous trouvons les

mêmes caractères que chez le cobaye de contrôle, mais à un moindre degré; ce sont les signes de la fièvre charbonneuse, mais la rate n'est pas congestionnée, il y a aussi moins d'œdème local.

Ces caractères sont particuliers aux cobayes inoculés au préalable avec la culture formolée.

**Première série d'essais d'immunisation des cobayes
avec cultures formolées de la bactériodie charbonneuse.**

TABEAU C

N ^{os} des ballons	Dates d'ensemencement	Nature de la culture	Durée du séjour à l'étuve	Résultats de l'inoculation aux cobayes
A-I	Ensemencé 5 novembre 1925.	Culture de bac- tériodie dans 100 c. c. de bouillon pep- toné.	15 novembre inoculé 2 co- bayes 1 c. c. chacun mise à l'étuve de la cul- ture formolée durant 10 jours.	Le dixième jour on injecte 1 c. c. de la culture formolée à deux cobayes.
A-II		Après 24 heu- res, on ajoute 8 gouttes de formol.		Aucun phénomène à signaler dans les jours qui suivent.
B-III	—	Bouillon pep- toné 100 c. c.	10 novembre mis du formol, en- suite mis à l'étuve.	24 heures après ils avaient un peu d'œdème local. L'un demeure bien portant, l'autre meurt après 24 h.
B-IV		Après 5 jours on ajoute 8 gouttes de formol.	18 novembre ino- culé 2 cobayes 1 c. c. chacun.	mais il ne présente pas les symptômes, ni les caractères de la fièvre charbon- neuse.
C-IV	—	Bouillon pep- toné 100 c. c.	14 novembre mis du formol et laissé à l'étuve ensuite.	24 heures après des deux cobayes ino- culés, l'un reste bien portant, l'autre présente de
C-V		Après 8 jours, on ajoute 8 gouttes de formol.	20 novembre ino- culé 2 cobayes 1 c. c. chacun.	l'œdème local au point d'inoculation et meurt quatre jours après (24-11- 25). A l'autopsie, on ne constate au- cun symptôme de fièvre charbon- neuse.

(16-12-25). Inoculation de l'émulsion du bacille du charbon vivant et virulent aux cobayes traités marqués : A-I, B-III, C-IV et à un cobaye de contrôle. Deux jours après tous sont morts. A l'autopsie, les cobayes traités A, B, C, présentent des caractères très légers de fièvre charbonneuse. Ces caractères sont beaucoup plus développés chez le cobaye de contrôle.

DEUXIÈME SÉRIE D'ESSAIS D'IMMUNISATION DES COBAYES CONTRE LA FIÈVRE CHARBON- NEUSE AVEC DES CULTURES MODIFIÉES PAR LE FORMOL

(INOCULATIONS ET SCARIFICATIONS)

Le 22 décembre 1925, nous avons préparé le bouillon peptoné pour faire la culture de la bactériidie charbonneuse. Le 4 janvier 1926, nous avonsensemencé le bacille dans le bouillon peptoné d'un ballon contenant 100 centimètres cubes, et nous l'avons laissé dans l'étuve. Vingt-quatre heures plus tard, ce bacille est bien développé. Ensuite, nous avons mis VIII gouttes de formol dans cette culture et nous l'avons laissée dans l'étuve durant quatre jours.

Quatre jours plus tard, le 8 janvier, nous avons inoculé, par injection sous-cutanée, II gouttes de cette culture à 2 cobayes, pesant 350 grammes chacun; et nous avons inoculé, par injection sous-cutanée également, V gouttes de la même culture à 2 cobayes, pesant chacun 400 grammes.

Nous avons fait des scarifications avec V gouttes de la même culture sur la peau du dos de 2 cobayes pesant 450 grammes chacun. Et nous avons opéré de la façon sur 2 cobayes pesant 500 grammes chacun, mais à la dose de X gouttes de cette même culture, à chaque cobaye.

Le 9 janvier, vingt-quatre heures plus tard, les cobayes présentent les symptômes suivants : il y a de l'œdème local, de l'inappétence, de la tristesse, quatre jours plus tard tous les symptômes ont disparu. (Nous avons mis à part la

moitié de ces cobayes pour répéter une deuxième fois l'expérience).

Quelques jours plus tard, les cobayes scarifiés ont maigri peu à peu, dix-sept jours après, les cobayes scarifiés sont tous morts; mais les cobayes inoculés sont bien portants.

AUTOPSIE. — Les cobayes morts ne présentent pas les caractères de la fièvre charbonneuse. Et en examinant le sang de la rate au microscope, nous n'avons pas trouvé le bacille.

Vingt jours plus tard, nous avons inoculé aux deux cobayes restants, par injection sous-cutanée, l'émulsion de la culture du bacille du charbon vivant, à la dose de 1 centimètre cube chacun. Deux jours après, ces cobayes sont morts de charbon. Ils présentent bien en effet à l'autopsie les signes caractéristiques de la fièvre charbonneuse.

TROISIÈME EXPÉRIENCE

Le 12 janvier 1926, nous avonsensemencé le bacille du charbon dans un ballon contenant 100 centimètres cubes de bouillon peptoné, qu'on a laissé dans l'étuve.

Le 13 janvier, nous avons examiné le bacille du charbon dans ce bouillonensemencé depuis vingt-quatre heures. Le bacille est bien développé. Ensuite, nous avons mis VIII gouttes de formol et nous avons laissé cette culture dans l'étuve pendant quatre jours.

Dix jours plus tard, le 17 janvier, après la deuxième expérience, nous avons fait des inoculations et des scarifications avec cette culture formolée depuis quatre jours. Nous avons répété avec la même dose que dans la deuxième expérience, les inoculations et les scarifications; mais nous avons pris la moitié des cobayes qui avaient subi la deuxième expérience le 8 janvier dernier :

1° Nous avons inoculé II gouttes de ce bouillon sous la peau d'un cobaye;

2° Nous avons inoculé V gouttes du même bouillon sous la peau d'un cobaye;

3° Nous avons fait la scarification avec V gouttes sur la peau du dos d'un cobaye:

4° Comme au n° 3, mais en prenant X gouttes de ce bouillon.

Le 18 janvier 1926, après vingt-quatre heures, il y a un peu d'œdème localisé à l'endroit où ont été faites l'inoculation et les scarifications. Les cobayes sont tristes, ils ont de

l'inappétence. Quelques jours plus tard, les cobayes scarifiés ont maigri et montrent de la faiblesse.

Neuf jours plus tard, le 25 janvier 1926, un cobaye scarifié, avec V gouttes de formol, est mort. Nous avons fait l'autopsie de ce cobaye mort. Il présente de l'amaigrissement, mais il ne montre aucun des signes de la fièvre charbonneuse. Nous avons examiné et ensemencé le sang du cœur et de la rate, nous n'y avons pas trouvé de bacilles.

De dix à quinze jours plus tard, le 29 janvier 1926, nous avons inoculé l'émulsion du bacille du charbon vivant qui s'est bien développé depuis vingt-quatre heures dans l'étuve, aux trois cobayes traités restant, par injection sous-cutanée de 1 centimètre cube chacun. Les cobayes traités restant sont :

2 cobayes inoculés
1 — scarifié.

Le 1^{er} février 1926 (trois jours après), tous les cobayes inoculés sont morts de charbon. Nous avons autopsié ces cobayes. Tous les trois présentent bien les caractères de la fièvre charbonneuse. Nous avons examiné la rate, le sang au microscope, par diverses méthodes de coloration, surtout par la méthode de Gram. Il y avait de très nombreuses bactériidies charbonneuses.

QUATRIÈME EXPÉRIENCE NOUVEL ESSAI DE VACCINATION

Le 17 février 1926, nous avonsensemencé le bacille du charbon dans 100 centimètres cubes de bouillon peptoné. Nous avons laissé cette culture dans l'étuve pendant quarante-huit heures, ensuite nous avons ajouté VIII gouttes de formol. A nouveau, nous avons laissé en contact durant quarante-huit heures dans l'étuve (le premier vaccin).

Le 10 février, nous avons fait une inoculation sous-cutanée de cette culture à 4 lapins à la dose suivante :

1 ^{er} lapin	1 centimètre cube.
2 ^e —	3 — —
3 ^e —	6 — —
4 ^e —	10 — —

Le 2 mars 1926, nous avons inoculé le deuxième vaccin (semblable au premier obtenu, en laissant la culture en contact avec le formol durant vingt-quatre heures seulement), nous avons inoculé à nouveau les 4 lapins vaccinés avec la même dose.

Dix jours plus tard, le 12 mars, nous avons inoculé 1 centimètre cube de bacille vivant aux 4 lapins vaccinés et 1 cobaye témoin. (Le bacille vivant est dans une dilution formée d'un centimètre cube de culture de bouillon âgé de 24 heures et 10 centimètres cubes de sérum physiologique). Quarante-huit heures après, le cobaye contrôle est mort de charbon, cinq jours plus tard, tous les lapins sont morts.

CINQUIÈME EXPÉRIENCE NOUVEL ESSAI DE VACCINATION

Nous avons cultivé le bacille du charbon sur la gélose durant vingt-quatre heures dans l'étuve. Nous avons fait une émulsion avec 10 centimètres cubes de sérum physiologique, ensuite nous avons mis 11 gouttes de formol, et nous avons laissé en contact dans l'étuve pendant une heure (Premier vaccin).

Le 17 mars 1926, nous avons inoculé ce vaccin à un cobaye et à deux lapins pesant 2 kilogrammes, environ, chacun, à la dose suivante :

1 cobaye	1 / 4 centimètre cube.
1 lapin	1 / 2 — — —
1 — —	1 — — —

Une semaine plus tard, le 24 mars, nous avons inoculé le deuxième vaccin au cobaye et aux deux lapins déjà traités, aux mêmes doses que la première fois (le deuxième vaccin semblable au premier, mais nous avons laissé en contact une demi-heure seulement).

Une semaine plus tard, le 31 mars, nous avons inoculé le bacille vivant aux 2 lapins vaccinés et au cobaye vacciné, en même temps qu'à un cobaye témoin : 1 centimètre cube chacun. (Le bacille vivant est dans une dilution formée d'un centimètre cube de culture du bouillon âgé de 24 heures et 10 centimètres cubes de sérum physiologique).

Trois jours plus tard, le 3 avril, le cobaye contrôle est mort de charbon, mais les 2 lapins traités sont bien portants.

Cinq jours plus tard, le cobaye vacciné meurt de charbon.

Les lapins traités, vaccinés, sont toujours indemnes.

B) Le 14 avril, nous avons répété l'expérience A, nous avons inoculé le premier vaccin (comme pour l'expérience A) à 4 cobayes pesant 450 grammes chacun et à 4 lapins pesant environ 2 kilogrammes chacun, à la dose suivante :

2 cobayes	marque I	1 1/2 centimètre cube.
2 —	— II	1 — —
2 lapins	— I	1 1/2 — —
2 —	— II	1 — —

Une semaine plus tard, le 21 avril, nous avons inoculé le deuxième vaccin aux 4 cobayes vaccinés et aux 4 lapins vaccinés aux mêmes doses que celles ci-dessus.

Une semaine après le 27 avril, nous avons inoculé le bacille du charbon vivant en grande quantité aux animaux vaccinés et à un cobaye témoin : 1 centimètre cube chacun.

Vingt-quatre heures après, le 30 avril, le cobaye témoin est mort, trois jours plus tard, les cobayes traités sont morts, quatre jours plus tard, le 4 mai, les lapins marqués I sont morts.

Six jours plus tard, les lapins vaccinés marque II sont morts. (*Observation* : Nous avons fait l'autopsie et examiné au microscope, les cobayes vaccinés et les lapins vaccinés. Ils présentent les signes de la fièvre charbonneuse, mais la rate n'est pas congestionnée et il y a peu de bacilles.

RÉSULTAT DE CETTE EXPÉRIENCE

1° L'expérience A, donne un bon résultat, l'épreuve est satisfaisante nous donnant une immunisation presque complète sauf un cobaye vacciné qui est mort, n'ayant pas été immunisé.

2° L'expérience B, entreprise dans les mêmes conditions, prouve la solidité de l'immunisation, mais tous les animaux sont morts ayant été soumis à une trop forte dose de culture de la bactérie charbonneuse.

CONCLUSIONS

1° L'aldéhyde formique exerce une action inhibitrice très marquée sur la bactériodie charbonneuse ;

2° Le sérum de cheval gélifié par addition de formol ne permet pas le développement de la bactériodie charbonneuse ;

3° Les cultures de la bactériodie charbonneuse en milieu liquide, additionnées de formol, dans la proportion de 4 ‰, laissées à l'étuve quelques jours ou plusieurs semaines, sont d'une remarquable innocuité pour les cobayes ;

4° Les mêmes cultures ainsi modifiées, soumises à l'action du formol pendant un temps variable, ne se sont pas montrées capables de protéger le cobaye contre l'inoculation de la bactériodie charbonneuse. Les résultats sont les mêmes que le « prétendu vaccin » soit inséré par inoculation sous-cutanée ou par scarification ;

5° Les bactériodies recueillies sur de la gélose, laissées en contact avec le formol, respectivement une heure ou une demi-heure, inoculées au lapin, le protègent contre une inoculation mortelle pour un cobaye témoin ;

6° Dans tous les essais, l'immunité conférée n'est que relative, il est possible de surmonter une résistance qui n'est pas absolue.

Vu : le Président de thèse,

LEMIERRE

Vu : le Doyen,

H. ROGER

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,

LAPIE

BIBLIOGRAPHIE

- Tropical Veterinary Bulletin*, vol. 13, 30 mai 1925.
- SANARELLI. — Charbon interne « chez les animaux rendus » porteurs de spores charbonneuses, *Acad. Sci.*, 1924, 17, vol. 179, n° 20, p. 1.100-1.103.
- MONOD (T.) et VELU (H.). — L'intradermo-vaccination en un temps contre le charbon bactérien et ses avantages, *Soc. Biol.*, 1925 fév., vol. 92, n° 4, p. 251-253.
- VELU (H.). — Essai concluant d'intradermo-vaccination contre le charbon bactérien en milieu profondément infecté, *Bull. Soc. Path. Exot.*, nov. 1924, vol. 17, n° 9, p. 767-770.
- DESCAZEUX (J.). — Essai de cutivaccination anticharbonneuse, *Bull. Soc. Path. Exot.*, nov. 1924, vol. 17, n° 9, p. 765-767.
- STROSZNER (E.). — *Ueber Milzbrandimmunität und Milzbrandschutzimpfung.*
 — *Seuchenbekämpfung*, Vienna, 1925, vol. 2, n° 1/2, p. 79-90.
- SANFELICE (Francesco). — Intorno alle mutazioni del bacillo del carbonchio, *Bol. d. Istituto Sieroterap.*, Milan., nov. 1924, vol. 3, n° 6, p. 341-352.
- ZIRONI (A.). — Osservazioni sul lavoro del prof. F. Sanfelice Intorno alle mutazioni del Bacillo del carbonchio *Bol. d. Sieroterap., Milanese.*
2. BROCC-ROUSSEU et URBAIN. — Cuti-vaccination et cuti-immunité chez le cobaye, *Bulletin de l'Institut Pasteur.* Revues et analyses, n° 20, 31 octobre 1925, t. XXIII, p. 909-910.
 3. *Revue Vétérinaire militaire.* Au sujet de la durée de l'immunité conférée aux animaux vaccinés contre le charbon bactérien par la méthode intradermique en un temps (Velu et Vaysse), t. IX, 30 septembre 1925, 3 fascicules, p. 242.
 4. CALMETTE (A.) NÈGRE (L.) et BOQUET (A.). — *Manuel technique de microbiologie et sérologie*, 1925.

5. MOLLEREAU (H.), PORCHER (C.-H.) et NICOLAS (E.). — *Vade-Mecum du Vétérinaire*, 1924.
6. NOCARD (Ed.) et LECLAINCHE (E.). — *Les maladies microbiennes des animaux*, 1903.
7. COURMONT (J.) et PANISSET (L.). — *Précis de Microbiologie des maladies infectieuses des animaux*, 1914.
8. BEAUVY (Armand). — *Sérums et Vaccins*.
9. VELU (Henri), BAROTTE (Jean) et BRUMPT (E.). — *Eléments pratiques de Pathologie Vétérinaire Exotique*.
10. MOSNY, BERNARD (L.), GALLOIS, MÉNÉTRIER, VAILLARD, GILBERT, FOURNIER, DE BEARMANN, GOUGÉROT, BOGER, RENON, DESCHAMPS, BROUARDEL (G.), GEUART. — *Maladies parasitaires communes à l'homme et aux animaux*.
11. COURMONT (P.), ROCHAIX (A.). — *Précis d'hygiène*.
12. CONTE (A.). — *Jurisprudence Vétérinaire*.
13. MOUSSU (G.) et MOUSSU (Raymond). — *Traité des maladies du gros bétail*.
14. PARISOT (Jacques) et SIMONIN (Pierre). — *Les vaccins et la pratique de la vaccinothérapie*.
15. RENNES (J.). — *Inspection des viandes de boucherie*.
16. MONVOISIN (A.). — *Le lait. Physiologie. Analyse. Utilisation.*
— *(Bactériologie de la mamelle et du lait.)*
17. GOBERT (H.-J.). — *Aide-Mémoire du Vétérinaire*.
18. GRATIA (A.). — *Production d'anticorps dans la cuti-immunité anticharbonneuse. Comptes rendus, Société de Biologie, séance du 26 juillet 1924.*
19. BEZANÇON (Fernand). — *Précis de microbiologie clinique*.
20. AGASSE-LAFONT (E.). — *Les applications pratiques du laboratoire à la clinique*.
21. MONVOISIN (A.). — *Précis de diagnostic médical*.
22. DOPTER (Ch.) et SACQUEPÉE. — *Précis de Bactériologie*.
23. LEHMANN-NEUMANN-PHILIBERT. — *Manuel de bactériologie*.
24. STITT. — *Practical Bacteriology, Blood Work, Parasitology*.
25. COURTENAY (Edward). — *Manuel of the practice of Veterinary Medicine*.
26. VIRGIL SACHELARIÉ. — *Etude comparative sur l'immunité conférée par la vaccination anticharbonneuse pratiquée par inoculation dans la peau et par la vaccination pasteurienne classique chez les bovins.*
— *Revue générale de Médecine Vétérinaire*, 15 mai 1925, p. 229.

27. BESREDKA (A.). — Immunisation locale. Pansements spécifiques.
28. VALLÉE. — Fièvre charbonneuse (cours supérieur de microbiologie de l'Institut Pasteur) (Paris, 1923-1924).
29. NEWODOFF (A.-P.). — De la cutivaccination et de la cuti-immunité dans le charbon, t. XXXIX, novembre 1925, n° 11.
- HRUSKA (Charles). — Recherches expérimentales sur le charbon, 1925.
30. TADA (Adelhuin) et KATKIN, etc.
 - Mécanisme de l'infection et de l'immunité de la fièvre charbonneuse.
 - *Bulletin de l'Institut Pasteur*. Revues et Analyses, t. XXIII, n° 12, 30 juin 1925, p. 537-539.
31. Union of south Africa, department of agriculture. The fifth and sixth reports of the director of veterinary research, avril 1918.

TABLE DES MATIÈRES

Tableau du personnel enseignant de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.	4
Hommages et <i>in memoriam</i>	5

PREMIÈRE PARTIE

La fièvre charbonneuse au Siam. Etude au point de vue sanitaire.	13
La bactériémie charbonneuse.	16
Immunisation par les cultures atténuées, séro-vaccination. . .	21
Vaccination contre le charbon bactériémique (la méthode actuelle).	28

DEUXIÈME PARTIE

Notions générales sur les anatoxines	33
Recherches expérimentales personnelles.	49
Première série d'expériences.	49
Deuxième série d'expériences.	50
Nouveaux essais sur la toxicité des cultures de la bactériémie charbonneuse.	53
Première série d'expériences sur l'immunisation contre l'infection charbonneuse expérimentale du cobaye au moyen de cultures formolées inoculées sous la peau	55
Deuxième série d'expériences sur l'immunisation contre l'infection charbonneuse expérimentale du cobaye au moyen de cultures formolées inoculées sous la peau ou par scarifications.	59
Troisième série d'expériences	61
Quatrième et cinquième série d'expériences sur l'immunisation contre la fièvre charbonneuse avec des cultures formolées inoculées à des cobayes et à des lapins.	63
CONCLUSIONS.	66
BIBLIOGRAPHIE.	67

